

B39

Prof. M. SEGALE, Libero docente

Laboratorio Batteriologico Militare - Laboratorii Scientifici degli Ospedali Galliera Genova

Ricerche batteriologiche sulla Pandemia 1918
Riproduzione sperimentale di sindromi grip-
pali con Str. Pandemicus (N. Sp. 1918) *

Questa nota apparve nel N. 243 di *Pathologica* del 1 Gennaio 1919

393

RICERCHE BATTERIOLOGICHE SULLA PANDEMIA 1918

RIPRODUZIONE SPERIMENTALE DI SINDROMI GRIPPALI

CON STR. PANDEMICUS (N. Sp. 1918)

Prof. M. SEGALE, Libero docente

Laboratorio Batteriologico Militare - Laboratorii Scientifici degli Ospedali Galliera-Genova

Le indagini qui riassunte tendono a definire batteriologicamente un germe che si è isolato in buona percentuale dal cadavere di influenzati e che risulta capace di riprodurri nel coniglio, nella cavia, nel ratto, sindromi e localizzazioni anatomo patologiche dell'apparato respiratorio non molto dissimili da quelle che si riscontrano nei gripposi.

Per attenuare la istintiva reazione di difesa necessariamente conseguente ad ogni tentativo di chiarimento etiologico della attuale pande-

(1) Nel decorso Maggio all'inizio apparente di questa pandemia, mi occupai di ricerche in soggetti colpiti dalla forma più comune cioè febbre di due o tre giorni con stato astenico grave, lieve rinofaringite e lento ripristino cenestesico.

Si trattava di militari che erano ricoverati in ospedale nelle prime ore dell'accesso: all'esame del muco faringeo si riscontrava in cultura quasi pura una forma meningococco simile e non si vedeva nessun'altra forma che potesse esser sospettata di somiglianza col b. di Pfeiffer. Le culture per il Pfeiffer furono allora sempre negative.

Questo reperto costantemente negativo mi diede la sicurezza non potersi trattare in tali casi di una infezione dovuta al b. di Pfeiffer in quanto il gran numero di esami fatti nelle migliori condizioni di ospedalizzazione dei soggetti mi avrebbe dovuto dimostrare almeno con una percentuale ragionevole la presenza del germe incriminato.

[Il reperto di b. di Pfeiffer lo ebbi in qualche caso dal muco faringeo o dall'espettorato nel decorso settembre-ottobre ma non ho fatto indagini sistematiche in quanto risulta da sicure ricerche del prof. Canalis che oltre le 18 ore dall'inizio dei sintomi è difficilissimo rinvenirlo, ed io avevo invece in quel periodo casi in pieno sviluppo di malattia].

Le emocolture dei soldati ammalatisi nel decorso maggio-giugno, mi avevano dato con una frequenza che rasentava la costanza [purché la prova fosse fatta nelle prime 24 ore] lo sviluppo di un germe a tipo meningococcico non patogeno per gli animali, che ho trasmesso a vari colleghi perché volessero confrontarlo con i loro reperti eventuali.

Il sangue dei convalescenti agglutinava questa forma a titolo alto.

Lo studio più esteso dell'argomento mi ha dimostrato che non poteva trattarsi del germe patogeno perché:

1. — nello stesso mio laboratorio colla identica tecnica si ebbero nell'agosto e nel settembre una lunga serie di risultati negativi intramezzati a risultati positivi.

ma, dirò subito che il germe di cui si tratta sembra osservato nel gripe da innumerevoli studiosi, ma non fu mai regolarmente identificato, né fu mai provato il potere patogeno della cultura pura, seguendo la via d'infezione più naturale.

Le presenti ricerche furono precedute da altre sulle quali non credo il caso di diffondermi ma che ricordo (1) in quanto mi hanno fatto ritenere presumibile:

1. — che il b. di Pfeiffer non abbia ac-

2. — Le agglutinzioni che dappprincipio erano costanti nei convalescenti militari del primo periodo e di identica provenienza, vennero ad esser negative in soggetti provenienti da svariate zone.

3. — I controlli fatti da colleghi davano risultati scontranti: in qualche caso si isolò lo stesso germe: in molti altri l'emocoltura riuscì negativa, in qualche zona si ebbero agglutinzioni anche 1/400, in altre non oltre 1/75, in altre negative.

4. — Il germe non risultava in nessun modo patogeno.

Confrontando la letteratura si constata che questo germe è stato visto da molti: citerò Pittaluga, Gotlich, Wittingham, Mc. Leon, Saccone, Stephan, Kolle, Bertarelli, Richet fils; alcuni lo considerano agente patogeno, ad es. Richet fils, senza nessun dato oltre che quello della frequenza, ma è opinione prevalente, che io condivido pienamente, che si tratti di un'associazione secondaria che assuma particolare evidenza numerica in determinate zone o in determinati gruppi di soggetti.

Nei casi da me studiati, il ceppo isolato non apparteneva certo ai tipi descritti da Lingelsheim, ma in sostanza, come giustamente dice Bertarelli, il reperto non ha importanza pratica.

Non è inopportuno ricordare che in quell'epoca ebbi occasione di incontrare alcuni ceppi che non riuscivano a purificare. L'inquinamento era manifesto ma crosopicamente perché le singole colonie presentavano dopo qualche giorno punticini più scuri e rifrangenti.

Microscopicamente le culture sembravano pure, però si aveva talvolta forme a catenella, e in sangue glucosato (patina gialla) si osservavano forme più piccole e più grosse.

Colla esperienza di questi mesi credo di poter ritenere che nel maggio scorso, con tutta probabilità, in qualcuna delle emocolture fatte, era venuto fuori anche il germe che fa oggetto di questa nota (tipo III) ma non riuscii allora ad isolarlo e assunse il predominio il simbionte non patogeno con morfologia grossolanamente non dissimile negli elementi singoli.

quistato dalle ricerche note nessun nuovo titolo per esser considerato l'agente di questa singolare forma morbosa ad epidemiologia spiccatamente esotica con lesioni anatomopatologiche a tipo pestoso, così diverse da quelle sindromi e lesioni che negli anni decorsi definivamo come influenza e bronco polmonite influenzale, dove il reperto del b. di Pfeiffer era frequente.

II. - che non sia ragionevole ammettere la produzione di sindromi e lesioni anatomopatologiche stereotipe a mezzo di associazioni batteriche svariate (pneumococco, stafilococco, streptococco piogenes, catarralis ed altri, dai singoli aa. isolati o presunti).

III - che non corrisponda ai comuni criteri sulle variazioni di virulenza dei germi e sulla diversa recettività dei soggetti uomini il ritenere che il germe inizialmente agente conservi immutata per infiniti passaggi attraverso l'uomo recettivo una patogenicità limitata quale è quella che si vuole attribuire al germe X visibile o ultravisibile e che si limiterebbe a ridurre la resistenza organica con una lieve reazione febbrile aprendo la porta ad infezioni secondarie sempre più gravi della iniziale e fondamentale, mentre è ben dimostrato per altre forme esotiche, come il colera, che lo stesso germe può dare infinite gradazioni di malattia: lievissime nella grande maggioranza dei soggetti, gravi e mortali in pochi.

IV. - che non sia metodo di elezione la ricerca di un germe ignoto dal muco faringeo o dal tessuto polmonare (ambienti di cui male si conosce la flora batterica normale o concomitante) dove l'indagine è necessariamente distratta dalle forme multiple che occorre volta a volta isolare ed identificare.

*
* *

Con questi criteri direttivi ho iniziato nel giugno scorso l'esame sistematico della flora batterica del cadavere recentissimo di influenzati facendo culture:

I. - dal sangue del cuore in quanto è a presumersi per il reperto clinico la grande frequenza di uno stato setticemico.

II - dal liquido cefalo rachidiano in quanto è frequentissimo il reperto anatomopatologico di una reazione meningoencefalica

III - da gangli linfatici ascellari che si trovano costantemente ingrossati, iperemici ed emorragici, quando esista lesione dell'apparato respiratorio

Ometto di proposito in questa nota i reperti ottenuti dal muco faringeo, dall'espettorato, dal polmone, dall'empiema, dalla milza.

*
* *

Nel sangue e nel liquido cefalo rachidiano ho riscontrato prevalentemente tre tipi di germi sui quali solo credo di soffermarmi omettendo la descrizione di reperti accidentali singoli che ritengo di importanza secondaria.

I. - una forma batterica lanceolata il più delle volte accoppiata

II. - una forma batterica pure frequentemente accoppiata a morfologia non dissimile dal meningococco

III. - una forma coccica simile alla precedente ma più piccola, alquanto più rotondeggiante con una faccia lievemente appianata, spesso accoppiata, formante nei terreni solidi, e spesso liquidi corte catenelle a 3-4 coppie, colle singole coppie bene distinguibili.

In generale la forma I e II non si riscontravano assieme; il più delle volte si aveva il reperto di una associazione I-III e III-II. Colorando gli strisci col Gram Weigert la forma I era sempre nettamente positiva, la forma II nettamente negativa e la forma III in generale negativa sebbene qualche elemento non perdesse totalmente il colore.

L'isolamento delle singole specie presenta difficoltà ben note ai molti che si sono accinti a questa impresa. La forma III sembra

Quadro riassuntivo degli esami batteriologici sul cadavere al 1° dicembre

AUTOPSIE N. 54

	Constatati nelle culture			Isolati in cultura pura		
	Sangue lcr gangli			Sangue lcr gangli		
Dipl. lanceol. gram positivo (Pneum. tipo. IV)	6	7	7	5	4	0
Pseudo meningococchi gram negativi	14	2	0	3	0	0
Strept. pandemicus	30	23	15	12	13	4
Altri reperti	9	2	3	8	2	0
Culture negative	16	18	8			

In due casi (1931, 1958) con sindrome iperacuta si è avuto sviluppo in cultura pura del solo str. pandemicus.

vivere in stretta simbiosi colle forme I e II; procedendo a diluzioni estreme si giunse talvolta ad avere in una piastra una sola colonia sviluppata e questa presentante due tipi ancora misti.

Nei gangli linfatici lo striscio dimostra il più delle volte elementi del tipo III in predominio e quasi sempre a coppie: nelle culture tuttavia non è raro riscontrare gli stessi inquinamenti che nel sangue e nel lcr

Nella serie di indagini qui riferite (sangue, lcr, gangli) non ebbi mai sviluppo di colonie strettamente emoglobino-file a tipo Pfeiffer.

E' degno di rilievo il fatto che la flora batterica del sangue, e del lcr dei cadavere recente di influenzati si limiti a pochissime specie. Oltre le sopra citate delle quali mi occupo di proposito, non riscontrai che in pochi casi uno streptococco nettamente gram positivo molitico che fermenta glucosio, saccarosio, lattosio, salicina e non la mannite e che dovrebbe classificarsi nel gruppo str. Piogenes, e in 5 casi un'altra forma diplostreptococcica, pure Gram Weigert incerta, gialla su sangue glucosato, formante colonie rotonde regolarissime trasparenti umbonate sul Levinthal, con sviluppo prevalente su agar glicerinato piuttosto che su agar glucosato, forma che non mi è risultata patogena, e che non ho più oltre cercato di identificare.

*
* *

In vari casi sono riuscito ad avere buone culture delle forme I lanceolate gram positive ed ho osservato che esse coagulano il siero con inulina, ingialliscono il sangue glucosato sono batteriolizzate dalla bile, uccidono il topino per iniezione sottocutanea in 24-48 ore con setticemia, onde tenuti presenti i dati morfologici, di colorabilità, biochimici, e biologici ho creduto di poter considerare queste forme come appartenenti al gruppo pneumococco.

L'agglutinazione con i sieri specifici I, II, III, cortesemente fornitimi dal prof. Flexner del Rockefeller Institut è riuscita negativa a diluzioni elevate onde dovrei concludere che si tratti del diplococco lanceolato tipo IV, ospite comune della cavità boccale e di un potere patogeno per l'uomo (secondo le ricerche di Cole) nullo o molto limitato. Noi sappiamo finora molto poco su questi diplococchi lanceolati gram positivi e solo in questi ultimi anni gli studiosi americani riprendendo ricerche troppo dimenticate di Foa e Banti tentano di mettere in chiaro il complesso argomento; dò quindi con riserva il risultato ed aggiungo che nel caso speciale di queste indagini, raggiunta quella approssimazione che ho sopra riferita,

non mi sono ulteriormente occupato dei ceppi il cui studio sistematico non risultava molto fruttifero mancando mezzi sia di definirli con più precisione sia di ottenere dagli animali qualcosa di diverso da una volgare setticemia, ed ho tralasciato ulteriori tentativi di isolamento, cercando anzi con ripetuti passaggi in bile di liberare le culture da questo pervicace associato.

*
* *

Pure poco conclusive sono le ricerche sulla forma II meningococciforme, in quanto io non ebbi culture sicuramente pure di essa se non in casi rari, e in periodi molto tardivi (3-4 mesi): anche dalle culture più diluite mi occorre di vedere comparire dopo qualche settimana qualche campione del tipo III

Tipo II e tipo III, resistono alla batteriolisi in bile e non si può ricorrere a questo artificio di separazione; nell'inoculazione agli animali, si ripescano quasi sempre assieme.

Per differenza cioè tenuto presente le caratteristiche del tipo III che sto per descrivere, e detraendole dalle apparenze delle culture miste dove esisteva tipo II e tipo III (tenuto anche presente le risultanze avute dalle 3 colture che credo pure) dirò che il tipo II ingiallisce il sangue glucosato formando colonie vistose, ha sviluppo tenue su agar glucosato e glicerinato formando colonie sottili a margine leggermente rilevato, trasparenti con qualche puntino all'interno dato dall'inquinamento del tipo III, (inquinamento che si manifesta magari dopo qualche settimana) buon sviluppo in terreni organici (Loeffler e Uovo) fermenterebbe i carboidrati in modo irregolare, talvolta il saccarosio e vari altri, tal'altra nessun carboidrato.

Iniettando qualche cultura che credevo pura, non ebbi il più delle volte alcuna reazione negli animali cavia, topino, coniglio ratto: in un caso di inoculazione endovenosa ebbe in cultura pure il tipo III: in un altro caso di inoculazione endonasale riscontrai all'autopsia ambi i tipi. Le tre culture, che credo pure, sono assolutamente senza azione

Per la morfologia, per i caratteri biochimici, per la mancanza di patogenicità per gli animali, credo probabile si tratti di un germe o di vari germi del gruppo pseudomeningococcico, tanto più che colle emulsioni di cultura in agar dei tre ceppi che credo puri, ebbi una agglutinazione a titolo mezzo limite dai sieri antimeningococcici, Pasteur A. B. C, e dai sieri antimeningococcici Roma e Milano. Il siero Berna non ha dato agglutinazione se non ad un titolo più basso.

Anche questo reperto non ha quindi una grande importanza, nè lo avrei riferito se non avessi visto largamente svolto da altri questo punto, tanto da assegnare al germe un valore patogenetico (Richet fils *Paris Med.* 1918 nov.), ed io penso che non sia improbabile qualche aa. sia tratto in inganno da queste culture miste attribuendo al germe valore patogeno sperimentale o sostenendo la trasformazione del tipo pseudomeningococcico II in tipo streptococcico III.

*
**

Il tipo III ha richiamato particolarmente la mia attenzione quando ebbi la prima volta occasione di isolarlo in cultura pura dal sangue e dal liquido cefalorachidiano di un soggetto (autops. 1931) morto con sindrome acutissima in poche ore, che presentò all'autopsia infarti emorragici polmonari, liquido pericardico emorragico, liquido c. r. emorragico, edema ed iperemia cerebrale, in quanto mi venne a spiegare quegli invincibili inquinamenti del ceppo II sopra riferiti ed altri con i quali avevo inutilmente lottato dal decorso giugno.

Il germe presenta le seguenti caratteristiche: morfologicamente appare come un piccolo cocco alquanto allungato con una delle faccie alquanto appianate e il più delle volte è accoppiato (tale si osserva negli strisci diretti del ganglio linfatico) o a brevi catenelle di 3-4 coppie (1).

Nelle culture, le singole coppie formano catene brevi nei terreni solidi specie nel sangue glucosato: catene più lunghe in altri terreni, specie se liquidi o in culture vecchie.

I diametri variano alquanto a seconda dei terreni: piccolissimo in sangue glucosato e in Levinthal (micron $0,8 \times 1,3$) alquanto più grosso in agar glucosato in brodo Loeffler o in uovo (micron $1,2 \times 1,7$).

Nelle catenelle dal brodo e dall'agar glucosato, si osservano spesso coppie più grosse, Gram Weigert resistenti (artrospore?): tale carattere è rarissimo in sangue glucosato.

L'aspetto generale delle catenelle nei terreni meno elettivi darebbe l'impressione di catene di piccoli meningococchi se i meningococchi dessero catene, forme più grosse e più piccole, più o meno colorate [colorazione con Tionina fenica]. In sangue glucosato questo reperto è meno frequente, i singoli elementi sono alquanto più piccoli, conservando però integra la morfologia.

Il germe si colora bene con i comuni colori di anilina; col metodo Gram solito rimane

colorato, col Gram Weigert, differenziando con olio di anilina, la decolorazione è completa purchè la emulsione sia sufficientemente diluita (1).

Nelle culture miste con pneumococco non vi è dubbio alcuno sulla decolorazione col Lugol di questa particolare forma; il pneumococco è nettamente Gram resistente anche col m. Gram Weigert.

Non ho mai potuto colorire una capsula nemmeno negli strisci di milza dove il germe si presenta isolato o a catenelle di 2-3 coppie.

Il germe osservato a goccia pendente è immobile.

*
**

Caratteri culturali.

Non si sviluppa in modo apprezzabile sotto i 25 gradi: buon sviluppo a 37-39. Abbastanza resistente alla luce diffusa. Vivo ancora dopo 10 giorni nei terreni culturali e in soluzione fisiologica; aerobio-anaerobio facoltativo.

Agar comune: nessun sviluppo apprezzabile.

Agar glicerinato: sviluppo insignificante.

Agar glucosato: piccole colonie omogenee umbonate a margini netti molto rinfrangenti senza tendenza a confluire.

Loeffler con inchiostro china: colonie larghe crateriformi a margine ondulato trasparenti sottili biancastre.

Terreno all'uovo con inchiostro china: colonie asciutte grigiastre a margini lievemente ondulati con lieve tendenza crateriforme.

In sangue glucosato sviluppo evidente; colonie grigio beige rotonde, prima omogenee lucide, indi crateriformi con lieve umbone centrale, poi con anello esterno elevato digradante lievemente alla periferia con una superficie rigettata; margini lievemente ondulati, centro finamente granuloso moruloide.

Sinteticamente le colonie isolate, su questo terreno, somigliano ad un sigillo di ceralacca grigio, questo quadro si raggiunge dopo 8-10 giorni.

(1) Credo opportuno di insistere sulla differenza di risultato tra Gram e Gram Weigert.

Non si tratta di una sottigliezza di tecnica, ma di un problema generale di classificazione.

Molti germi debolmente Gram positivi si decolorano nettamente colla modificazione di Weigert, che lascia perfettamente colorate le forme batteriche tipicamente Gram positive (carbonchio streptococco piogene, stafilococco aureo ecc.).

Nel caso presente, molti colleghi che hanno avuto occasione di studiare questo ceppo mi informano di ritenerlo Gram positivo, e lo è infatti, ma debolmente tanto che col Weigert si decolora purchè l'emulsione non sia densa.

Poichè ciò non accade ad es. collo Streptococco piogenes, credo meriti tener conto del valore del dato.

E' bene tener presente che il violetto di Genziana 1/100000 non inibisce totalmente lo sviluppo del germe.

(1) Per comprensibili ragioni tecniche le microfotografie seguiranno prossimamente.

Il sangue glucosato è terreno di scelta per la conservazione della vitalità e della virulenza e perché permette di rilevare prontamente la presenza di altri tipi a sviluppo difficile nei comuni terreni; il pneumococco da su questo terreno colonie di un color giallo canarino altri germi danno colonie di forma e tonalità cromatica spiccatamente distinguibili da questo e da altri streptococchi.

Lo sviluppo del tipo III in sangue glucosato, è relativamente lussureggiante, già evidente dopo 12 ore, sottoforma di goccioline formanti zigrinatura grigio beige translucida: la conservazione in vita su questo terreno è sufficientemente lunga; almeno quindici giorni a temp. ambiente.

Terreno Levinthal: colonie umbonate uniformi trasparentissime, nei primi periodi iden-

Note tecniche.

I. — *Prelevamento del materiale* — Cadaveri recentissimi non oltre le sei-otto ore dal decesso, preferibilmente di soggetti morti con sindrome iperacuta.

a) Prelevamento del lcr: incisa circolarmente la pachimeninge e reciso il setto falciforme, spostare rapidamente in basso gli emisferi, incidere il chiasma continuando la trazione ed aspirare con una lunga pipetta sterile il lcr all'imbocco del canale vertebrale.

b) Sangue: asportare lo sterno senza ledere il pericardio, sollevare con una pinza una piega del pericardio, inciderlo rapidamente senza affondare il tagliante, e, mantenendo sollevato il pericardio, cauterizzare il miocardio e trafiggerlo con una pipetta Pasteur, aspirando dalle cavità ventricolare qualche goccia. Diluire immediatamente in liquido di Ringer.

c) Gangli linfatici: depilare la regione ascellare, detergere con alcool, incidere la cute e asportare i gangli con strumenti mantenuti in alcool; scottare i gangli con paraffina a 110 per 5 minuti e mantenerli inclusi nella paraffina stessa in termostato a 37° per qualche giorno.

d) Milza: tecnica consueta.

II. — *Semine del materiale*. — Il Lcr puro e diluito in liquido di Ringer, il sangue del cuore il succo dei gangli linfatici conservati qualche giorno in termostato, il succo splenico diluiti in liquido di Ringer, vanno seminati nei seguenti terreni:

Agar glucosato, agar glicerinato, terreno all'uovo, sangue glucosato, sangue glucosato alla bile, siero Loeffler, Levinthal.

I primi accenni di sviluppo si hanno sul sangue glucosato e sul terreno all'uovo, talvolta dopo 12-24 ore. Scartare le colonie gialle in sangue glucosato o tenerne la purificazione seminando in bile pura a 37° per 2 ore.

Le semine negli altri terreni orientano rapidamente sulla morfologia, gli eventuali inquinamenti e le simbiosi. Il pneumococco non si sviluppa nel sangue glucosato con bile. Forme streptococciche con evidente sviluppo in agar glicerinato sono da scartarsi. Colonie granulose in agar glucosato o in Levinthal sono indizi certi di simbiosi.

Non fare le prove fermentative prima di avere isolato il ceppo almeno tre volte da colonie singole, morfologicamente tipiche (Gordon) in sangue glucosato.

Scartare o ripurificare colonie che coagulano siero diluito con saccarosio o con inulina.

Per le risemine di purificazione non è conveniente usare il comune metodo dello striscio prolungato dell'ago

tiche a quelle del Pfeiffer.

Terreni Hesse, Sabouraud, Müller, Mc Konkey sviluppo insignificante e nullo.

Patata glicerinata: nessun sviluppo.

Patata semplice, sviluppo discreto: dimostrato da una chiazza lucente con umidità persistente.

Gelatina: nessun sviluppo a 22. Messa in termostato a 37 e lasciata in seguito raffreddare si ha gelatina solida con sviluppo all'interno sotto forma di punticini bianchi disseminati nella massa.

Brodo semplice: nessun sviluppo.

Brodo glicerinato: nessun sviluppo.

Brodo glucosato: formazione di uno strato granuloso al fondo senza alcun intorbidamento.

Brodo glucosato con strato di olio sovrapposto: sviluppo scarso alla superficie di contatto senza formazione di stalattiti, senza in-

sul sangue glucosato o altri, in quanto la diluzione è di solito imperfetta e le irregolarità prodotte sulla superficie rendono difficile la definizione della morfologia delle piccole colonie.

E' preferibile diluire ogni singola colonia in piccole quantità di liquido di Ringer e seminare poi una grossa ansata della diluizione.

III. — *Colorazione Gram Weigert* — Emulsioni batteriche molto diluite. Colorazione 5 minuti con violetto genziana gr. 1,5, olio anilina gr. 3, alcool gr. 20 acqua 80; asciugare 2-3 minuti; liquido di Lugol; asciugare; olio di anilina fino a scomparsa di nubecole 5-10 minuti; lavaggio in acqua, ricolorazione in fucsina fenica Ziehl diluita 1/50 per 10 minuti.

IV. — *Preparazione dei terreni culturali*. — Reazione sensibilmente prossima a P H 8 nettamente alcalina al tornasole, ancora acida alla fenoltaleina, trattenuta al punto di viraggio della fenolsulfonftaleina.

a) Agar glucosato 1 o/o, agar glicerinato 3 o/o. Siero Loeffler secondo formula con aggiunta di inchiostro di China.

b) Terreno di Levinthal secondo formula, (Path. 1918 pag. 244) sterilizzato frazionatamente in Arnold.

c) Terreno all'uovo, tre parti di uovo e una parte di liquido di Ringer con aggiunta di inchiostro China: scaldati a 75 per quindici minuti.

d) Sangue glucosato: una parte di brodo glucosato e tre parti di sangue defibrinato di bue; scaldare a 80: per venti minuti, raffreddare lentamente.

e) Sangue glucosato con bile: sei parti di sangue defibrinato, una parte di brodo glucosato e una parte di bile scaldati a 85 per quindici minuti.

La perfetta sterilità di questi delicati terreni si ottiene addizionandoli con etere e facendo la distribuzione in tubi da saggio sterili con palloni Treskow mantenuti negli intervalli ripieni di etere.

L'etere si elimina facilmente mantenendo i tubi di saggio a 45° per un'ora.

f) Siero di sangue diluito per carboidrati e alcaloidi. Una parte di siero di bue prelevato a mezzo di palloni Centanni, tre di acqua distillata colla aggiunta del 5 o/o di tornasole neutro: autoclavare. Aggiungere i carboidrati o gli alcaloidi richiesti nella proporzione 1 o/o: sterilizzare frazionatamente in Arnold.

g) Agar molle per carboidrati e alcaloidi. Brodo neutro con aggiunta 1 o/o agar, autoclavare, filtrare, aggiungere tintura tornasole 5 o/o e carboidrati o alcaloidi nella dose 1 o/o. Sterilizzazione frazionata, solidificazione verticale, semina per infissione.

torbidamento, con formazione di deposito fiocoso al fondo, in periodo molto tardivo.

Siero di latte laccamuffato: non vira il colore e non precipita.

Lieve viraggio del tornasole in siero di bue diluito con lattosio, glucosio, maltosio, ma senza coagulazione della massa (salvo in periodi molto tardivi e irregolarmente). Frequente acidificazione o coagulaz. dello stesso terreno con salicina.

Non coagula il latte anche scaldato a 100 (Smith e Brown; *J. Med. Res.*, 1914, 31 455).

Forte azione emolitica su agar cosparso di eritrociti dove forma colonie identiche al Pfeiffer.

Non è affatto batteriolizzato dalla bile anche dopo 24 ore di contatto a 37; però nella bile pura non si moltiplica.

ATTIVITÀ BIOCHIMICHE

	Siero di bue diluito con aggiunta 1% della sostanza indicata e tint. tornasole 5%	Agar 1% con aggiunta della sostanza indicata 1% e tint. tornas. 5% (per iniezione)
Pentosi		
Arabinosio	nulla	—
Xilosio	—	—
Ramnosio (isodulcite)	nulla	nulla
Esoni		
Glucosio	lieve acidific. non coagula	lieve acidific.
Galattosio	nulla	—
Levulosio	nulla	—
Inosite	nulla	—
Biososi		
Saccarosio	non coagula	nulla
Lattosio	lieve acidific. non coagula	—
Maltosio	lieviss. acidif. non coagula	lieviss. acidif.
Trisosi		
Raffinosio	nulla	nulla
Gruppo cellulosi		
Amido	nulla	—
Inulina	nulla	—
Destrina	nulla	—
Alcool trivalenti		
Glicerina	nulla	—
Alcool tetraivalenti		
Eritrite	nulla	nulla
Alcool pentavalenti		
Adonite	—	—
Alcool esavalenti		
Sorbite	nulla	—
Dulcite	nulla	nulla
Mannite	nulla	nulla
Glucosidi		
Arbutina		non annerisce
Salicina	Acid. spesso coag.	—
Amigdalina	nulla	nulla
Azido		
Inges Proskauer	negativa	
Volone emolitica	negativa	
Azione sul rosso neutro	intensa	
Azagulazione del latte	negativa	
Colatina	negativa	
Geltiglia di cervello	non liquefa	
Poogeno solforato	non annerisce	
Idrone diastaseica	non forma	
	incerta	

* *

Le prove biologiche iniziate nel luglio scorso furono a principio oscure nel loro significato in quanto occorre discriminare quanto era in rapporto con la diversa recettività dei soggetti e quanto colla diversa virulenza dei ceppi.

Esporò analiticamente i dati principali riferiti al ceppo 1931 che ho fissato come campione (1). La virulenza del ceppo in 4 mesi di prove non ha notevolmente variato nei passaggi in sangue glucosato. Sembra molto ridursi in altri terreni meno opportuni.

A) Introduzione per via nasale.

Introduzione nella narice destra di un frammento di garza di 3-4 mm. di lato imbevuto di emulsione di cultura da sangue glucosato in liquido di Ringer. Occorre assicurarsi che il frammento sia introdotto abbastanza profondamente onde evitare che l'animale lo espella. Il piccolo corpo estraneo non ha di per sé per alcuna conseguenza patogena in rapporto alle lesioni qui studiate.

Conigli sani adulti (peso 1600-2200 circa) (14 esperienze).

L'animale non presenta apparentemente alcun disturbo per 3-4-6 giorni, salvo una lieve ipertermia al 2-3 giorno; sopravviene quindi uno stato generale di depressione, vi è congiuntivite, espirazione prolungata, dispnea più o meno intensa; all'ascoltazione si segue lo svolgersi del processo broncopolmonare: prima respiro aspro indi ronchi e rantoli, indi talvolta soffio bronchiale, [i competenti constatarono anche variazioni plessimetriche confermate dal reperto necroscopico] si ha stato subfebbrile o febbre manifesta, albuminuria intensa, forte diminuzione di peso (in un caso da 2160 a 1512) seguita talvolta da aumenti in rapporto ad oliguria, indi morte in 12-17-21 giorni.

In due casi al 10° giorno si ebbe marcata crisi termica, comparvero rantoli di ritorno, le condizioni generali erano molto migliorate e si uccisero gli animali.

(1) Mi riservo riferire quanto riguarda la comparazione dei singoli ceppi isolati i quali presentano variazioni di attività patogena notevoli specie in rapporto al periodo della malattia nella quale furono isolati.

Sinteticamente posso affermare che quanto più antico era il processo nel cadavere da cui il ceppo fu prelevato, tanto più limitata appare la attività patogena specie in rapporto alla attività sull'apparato respiratorio, in quanto predominano nell'animale iniettato fatti infiammatori lenti e sono ridotti di intensità e di numero le lesioni a tipo emorragico.

I ceppi che fino ad ora hanno dato risultato migliore, sono quelli contrassegnati con i numeri 1925, 1931, 1958, 1960 e tutti risultano recuperati da soggetti che soccomberono con sindromi acutissime.

Risultati in generale meno buoni, a parte le difficoltà dell'isolamento in cultura pura, ottenni da ceppi isolati da empiemi.

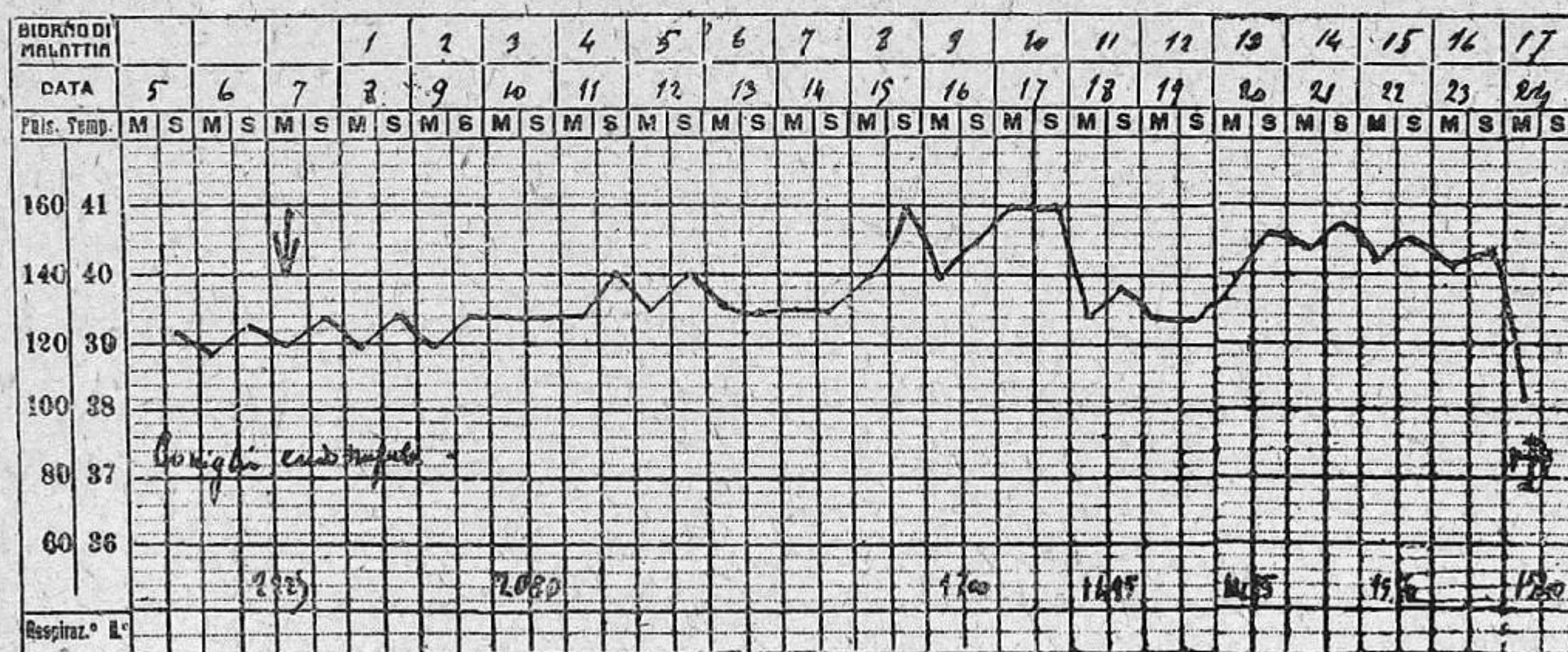
Le ricerche ematologiche eseguite per cura della Dott. Zappa che ne riferirà a parte, dimostrarono finora nelle prime 48 ore leucopenia e ipoglobulia, e indi in qualche caso iperglobulia e leucocitosi.

Il ricupero delle culture dagli animali morti spontaneamente o uccisi in periodi di crisi risolutiva non è stato costante.

polmonite o di polmonite lobulare confluyente frequenti focolai emorragici a tipo di infarto disseminati. Chiazze echimotiche sottopleuriche ed epicardiche.

Non si osservarono finora lesioni endocarditiche.

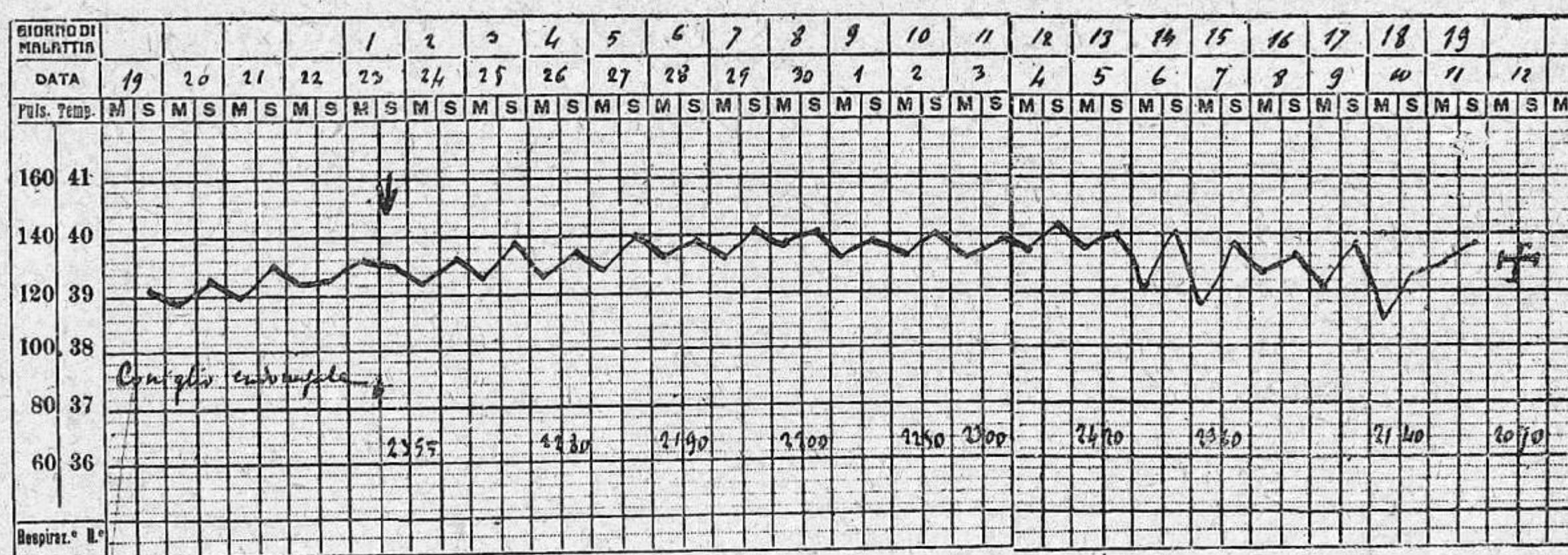
Nel fegato zone di necrosi ischemica; nel rene forte congestione e nefrosi acuta.



Curva termica del coniglio 56, inoculato nel naso con Str. Pandemicus. Reperto d'autopsia: Iperemia ed edema cerebrale, tracheite essudativa acuta, bronchite diffusa, forte congestione polmonare, peribronchite, empiema emorragico, stravasi emorragici nei pressi delle capsule surrenali, forte congestione del rene con rigonfiamento torbido a zone dei canalicoli contorti, focolai di necrosi ischemica al fegato.

Di regola negli animali a decorso prolungato il sangue del cuore è rimasto sterile: due volte si ottennero culture inquinate di pseudomeningococco, in un caso a decorso acutissimo si ebbe nelle culture una forma lanceolata gram positiva che non risultò agglutinata dai

In qualche caso emorragie retroperitoneali, sia attorno alle capsule surrenali, sia lungo la aorta addominale; in un caso emorragie nello psoas, in altro emorragie pericapsulari renali. In un caso empiema bilaterale, in altro leptomeningite, edema ed iperemia cerebrale, in



Curva termica del coniglio 69 inoculato nel naso con Str. Pandemicus. Reperto di autopsia: rinite caseosa, tracheite essudativa emorragica, bronchite diffusa, forte congestione dell'apparato polmonare, polmonite lobulare confluyente al lobo superiore sinistro, empiema emorragico a destra. Dilatazione acuta del cuore, forte congestione renale con ematoma corticale endo capsulare bilaterale, ematoma nello spessore del m. psoas a destra.

sieri Rockefeller I, II, III.

All'autopsia si constata forte stato congestizio della mucosa nasale, la trachea presenta forte iperemia ed edema della mucosa che è ricoperta di catarro viscido; vi è bronchite, peribronchite, talvolta focolai di bronco-

un caso emorragia della coclea, in altro forte iperemia uterina.

Il reperto del polmone varia notevolmente da caso a caso: talvolta il polmone è di colore scuro, al taglio fuoriesce abbondante liquido emorragico, la sostanza polmonare è

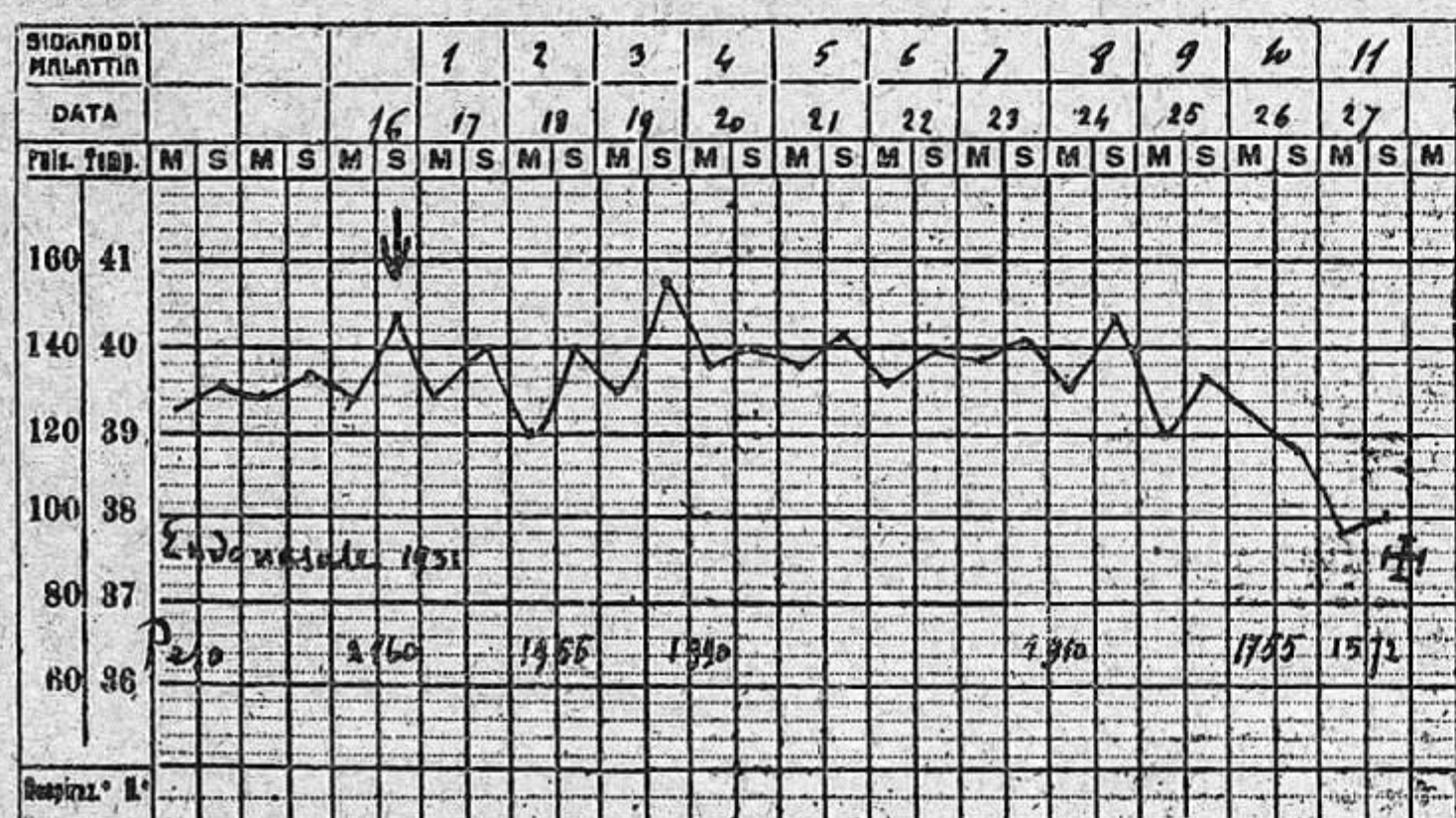
friabile, la superficie di taglio granulosa irregolare; talaltra il polmone forma una massa compatta di colore lilla uniforme: alla sezione si osserva una superficie granulosa lucida. Comprimendo fuoriesce dai bronchi qualche zaffo di catarro viscido.

Microscopicamente si osserva negli alveoli numerosissimi eritrociti, leucociti polimorfi soli o assieme a siero coagulato. In generale la fibrina è scarsa.

Molti alveoli contengono epitelii alveolari desquamati.

Frequentemente accanto a questi focolai broncopolmonitici appare un enfisema vescicolare acuto delle zone contigue.

Talvolta il reperto è meno persuasivo: si è in presenza di zone di infarto semplici: gli alveoli sono in parte ripieni quasi esclusivamente di eritrociti, in parte dilatati e l'apparato vascolare



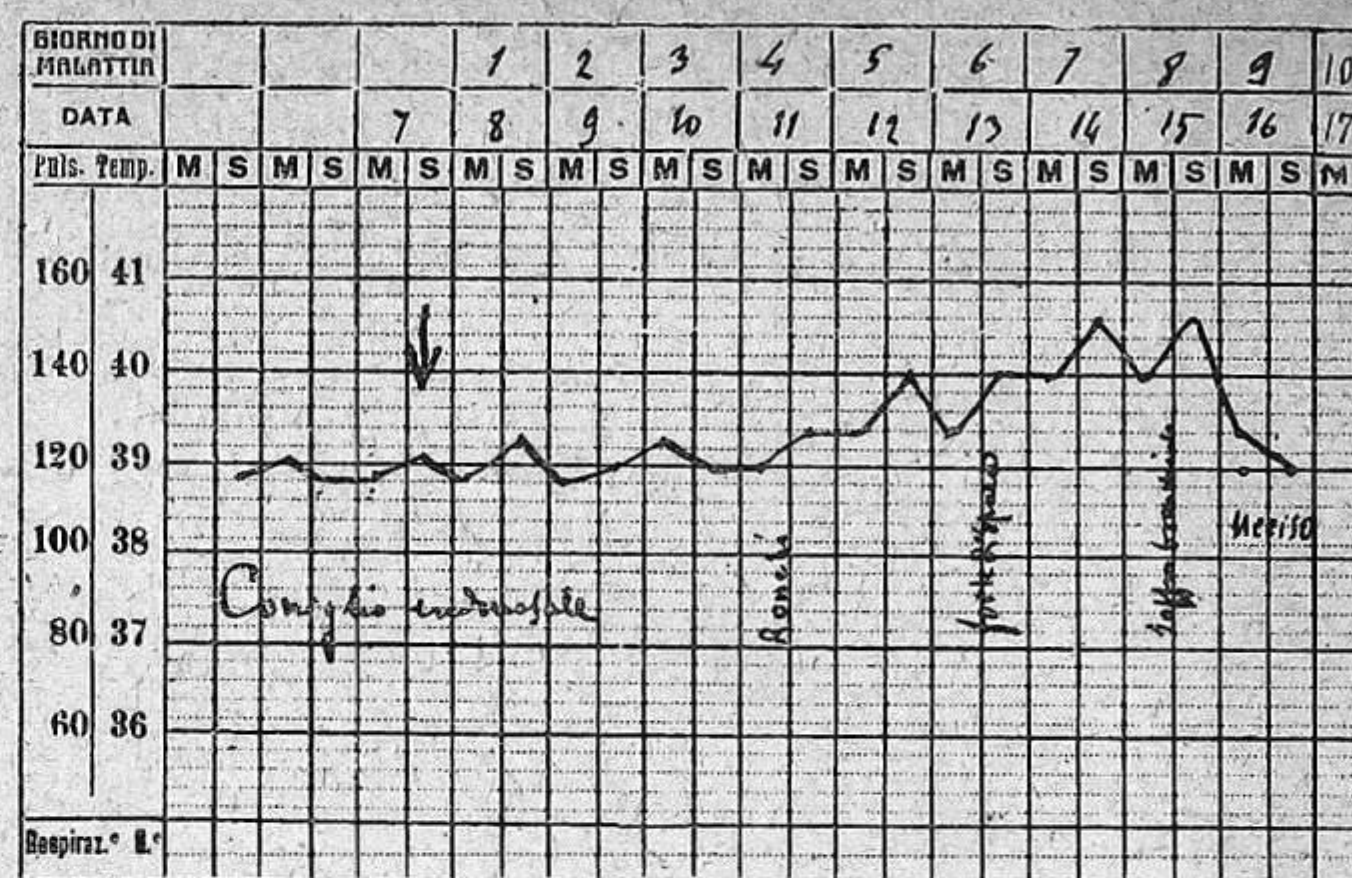
Curva termica del coniglio 64, inoculato nel naso con Str. Pandemicus. Reperto di autopsia. Rinite acuta tracheite essudativa necrotica, bronchite e peribronchite diffusa, focolai di broncopolmonite, congestione renale, necrosi ischemica al fegato, modica iperemia cerebrale, emorragie endouterine.

presenta una marcata congestione con frequente stravasi emorragici nel connettivo dei setti interalveolari.

Nei coniglietti sani, giovanissimi, del peso di gr. 800-1200, (8 esperienze), usando la stessa tecnica e talvolta la stessa emulsione, non si ottennero finora localizzazioni tipiche analoghe alle sopraricordate. Soltanto si osserva dopo 36-48 ore un lieve rialzo termico della durata di due tre giorni, senza che l'animale appaia notevolmente depresso. E' molto frequente una marcata diminuzione del peso (in un caso da 950 a 800 in quattro giorni).

La semplice introduzione di cultura nelle cavità nasali cospargendo la mucosa con patina culturale a mezzo della ansa di platino, non ha dato, in un caso, risultati manifesti.

Si è ottenuta una modica ipertermia in ot-

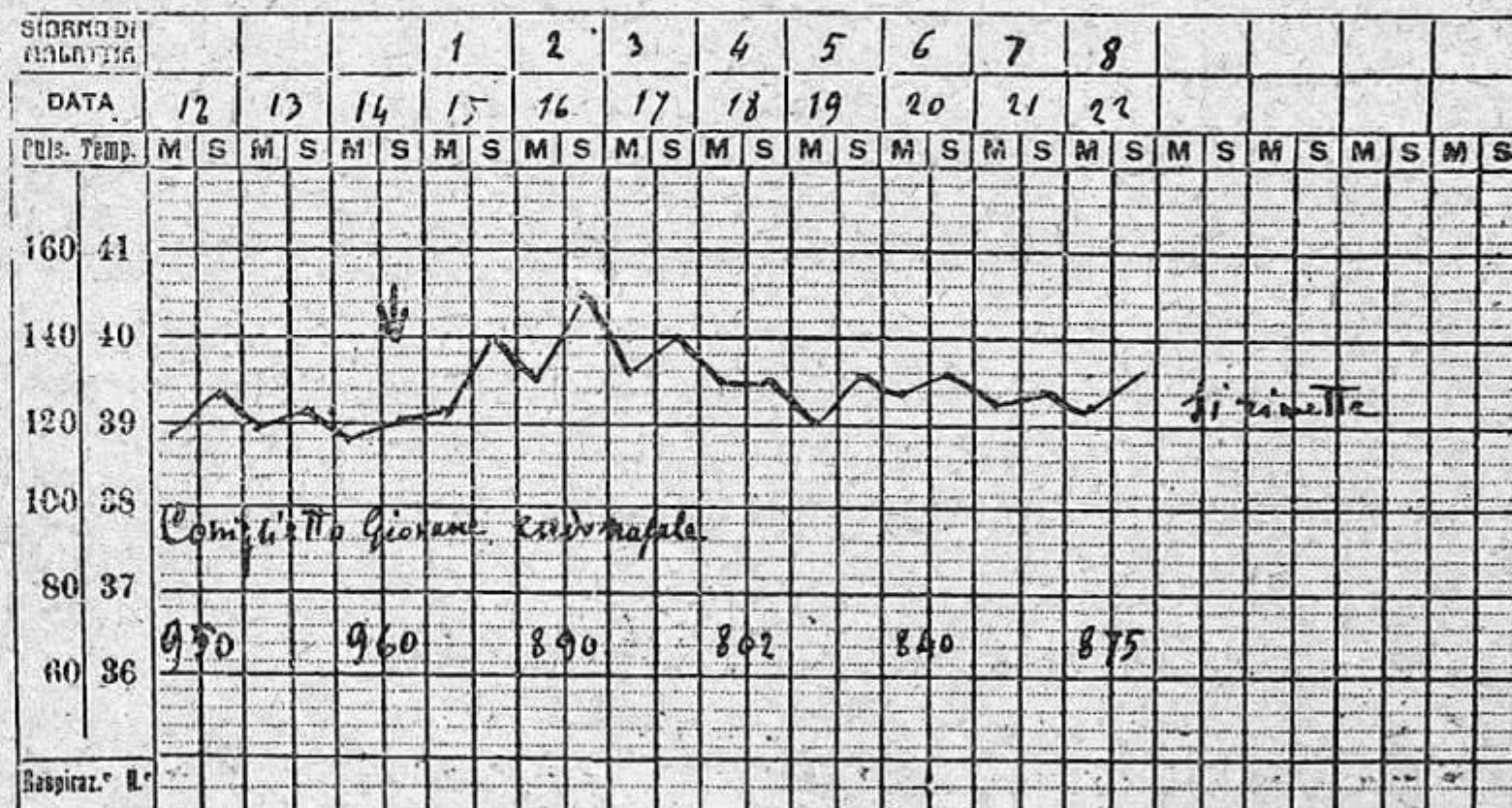


Curva termica del coniglio 46 inoculato nel naso con Str. Pandemicus. Fatti acustici nell'ambito polmonare iniziato il 4° giorno: al 10° giorno crisi termica e presenza di rantoli di ritorno. Si uccide l'animale: scarsa congestione tracheale: marcata iperemia ed edema bronchiale, focolai di broncopolmonite in via di risoluzione.

tava giornata che durò circa sei giorni, il reperto acustico dimostrava uno stato congestizio del polmone, ronchi, respiro aspro, però il peso non è diminuito notevolmente salvo nei primi tre giorni in cui variò da 1080 a 990.

Trattandosi di un animale giovane non è da escludersi che il reperto sia da riferirsi alla concausa della maggior resistenza, per quanto è da ritenersi che un lieve stimolo irritativo della mucosa nasale favorisca l'attecchimento del germe mentre il frammentino di garza introdotto, è di per sé assolutamente innocuo come dimostrano sei animali inoculati per controllo con altri ceppi streptococcici, tre dei quali vivono da tre mesi pur conservando visibile nel naso il corpo estraneo introdotto.

Non ho finora esperienze sufficienti per determinare il potere infettante nel muco tracheale degli animali morti: in qualche caso si ottennero ipertermie e dimagrimento intro-



Curva termica del coniglio 63 bis molto giovane, inoculato endonasale con Str. Pandemicus. Lieve reazione termica con notevole diminuzione di peso. All'ascoltazione qualche ronco in terza giornata.

ducendo nel naso il muco tracheale di conigli, ammalati, in altri casi il reperto fu negativo; nel periodo nel quale furono eseguite tali ricerche non era ancora stabilita la singolare minor recettività dei coniglietti giovanissimi onde le varie esperienze fatte hanno valore limitato.

Nella cavia adulta (5 esperienze) il reperto è identico a quello del coniglio. Il decorso è però assai più rapido.

In genere la morte sopravviene dopo 6-8 giorni con collasso termico e si riscontra oltre la forte tracheite anche i focolai bilaterali di broncopolmonite emorragica ed esudato emorragico in peritoneo.

Non ho fatto un gran numero di esperienze nella cavia perchè la introduzione del frammento di garza è assai indaginoso e non di rado si produce una piccola escoriazione provocata dallo sforzamento dell' ostio nasale.

E' possibile che la morte rapida consegua anche a questa complicanza, tenuto presente che è risultato più frequente che nel coniglio la localizzazione meningo encefalica.

Nel ratto adulto (6 esperienze), la infezione per via nasale (forse meno difficile che nella cavia) è stata seguita in qualche caso da morte dopo 7-9 giorni.

Si è avuta forte diminuzione di peso (da gr. 145 a 97 in un caso) e alla autopsia si osservò intensa tracheite, chiazze echimotiche sotto pleuriche, forte congestione dell'apparato polmonare, infarti disseminati. In un caso si notò pachimeningite emorragica, in altro meningite encefalite. L'esame microscopico non ha dimostrato veri focolai di bronco alveolite ma solo fatti bronchiali e peribronchiali accompagnati da forte congestione dell'apparato vascolare e da emorragie disseminate.

In un caso l'animale presentò forte dimagrimento (da gr. 230 a 160), dispnea, stato generale grave, ma non si ebbe la morte spontanea.

L'autopsia fatta in periodo tardivo dimostrò un processo pneumonico ai lobi superiori in via di risoluzione.

In una femmina gravida la morte sopravvenne dopo 9 giorni; non si osservarono lesioni polmonari, bensì essudato emorragico endo-peritoneale, forte congestione all' utero con liquido amniotico emorragico.

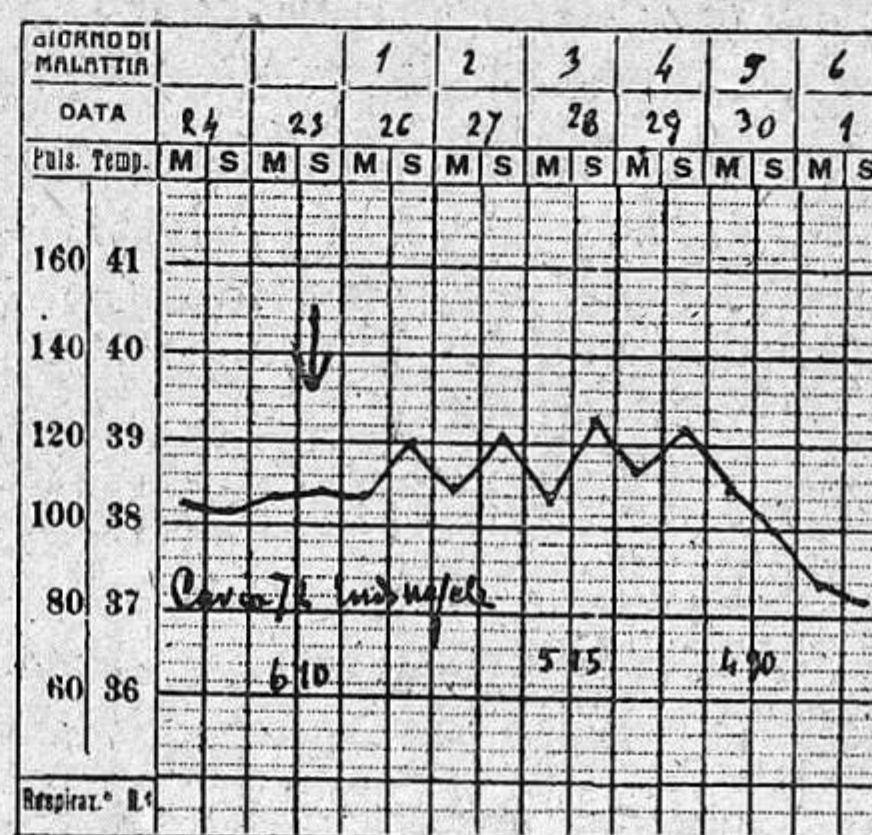
Nel topino per evidenti ragioni tecniche non ho ripetuta la tecnica usata negli animali più grossi. Mi sono limitato a far inspirare una emulsione di cultura, mantenendo il musino dell'animale in un piccolo cucchiaino di vetro ripieno della emulsione stessa.

I risultati ottenuti non sono finora costanti nè assolutamente probativi.

Il ceppo introdotto nelle cavità nasali dimostra forte attività patogena in animali recettivi come il coniglio, la cavia, il ratto adulto. Provoca lesioni discendenti dell'apparato respiratorio. In alcuni casi predominano fatti infiammatori con quadro di bronchite, peribronchite broncopolmonite disseminata, in altri si ha la netta confluenza dei focolai, in altri ancora il processo assume un carattere emorragico che presenta una suggestiva affinità con quanto si osserva nella presente pandemia.

Il laringe di solito non è interessato.

La inoculazione endonasale è di solito mortale con lesioni dei principali parenchimi: in



Curva termica della cavia 72, inoculata endo nasale con Str. Pandemicus. Reperto di autopsia: modica tracheobronchite, manifestaperibronchite: vari focolai di broncopolmonite, essudato pleurico emorragico bilaterale, essudato peritoneale emorragico, emorragie nella midollare surrenale, forte congestione renale.

qualche caso l'imponente lesione renale, con oliguria e albuminuria conseguente è probabile abbiano notevolmente contribuito all'esito.

Abbastanza di frequente, ma non sempre, si isola dal sangue del cuore il ceppo inoculato.

Si osservano spiccate differenze individuali in rapporto all'età dei soggetti: i conigli giovanissimi che risultano meno recettivi, manifestano la loro reazione con lieve ipertermia e perdita di peso.

✱

B) Introduzione per via sottocutanea.

Emulsione di cultura di sangue glucosato in liquido di Ringer.

Nel topino (19 esperienze) il germe non dimostra forte potere patogeno.

Iniettato sottocute in dose di due anse normali circa, si ha talvolta morte in 5-21 giorni con uno stato di cachessia progressiva; la cultura si è recuperata dal sangue del cuore in vari casi, e mai nelle cachessie marcate.

Il topino presenta uno stato di malessere non molto spiccato nei primi giorni con perdita di peso (gr. 4-6 per topini di gr. 18-23) ma spesso si rimette.

Nei soggetti venuti a morte anche dopo un mese si riscontra caseosi al punto di inoculazione con risentimento gangliare. L'apparato respiratorio è il più delle volte indifferente; si osserva talvolta una iperemia polmonare; milza grossa, spesso colture positive dalle masse caseose o dal sangue del cuore.

Nel ratto (4 esperienze), non si è ottenuta la morte anche prolungando la esperienza per circa un mese. Unico referto ma non costante un dimagrimento progressivo (in un caso da gr. 195 a gr. 135 in 20 giorni).

I ratti uccisi non presentarono al sommario esame compiuto, lesioni evidenti.

Il coniglio e la cavia (11 esperienze) sono assai più sensibili a dosi forti di cultura. Un quarto di cc. di emulsione appena opalescente inoculata sotto la cute dell'addome uccide questi animali in meno di 24 ore.

Come reperto di autopsia si ha di solito una essudazione peritoneale emorragica con forte iperemia dell'apparato respiratorio e qualche infarto emorragico marginale polmonare.

In qualche caso si è osservata manifesta iperemia tracheale.

Le culture, positive al punto della inoculazione, furono negative per il sangue del cuore e per l'essudato peritoneale.

Piccole quantità di cultura iniettate sottocute del dorso alla cavia, hanno dato uno stato marcato di ipereccitabilità nelle prime ore, indi nessun sintomo.

La temperatura non presenta forti oscillazioni. Talvolta sopravviene la morte in sei otto giorni, tal'altra l'animale sopravvive.

Il reperto di autopsia non è molto appariscente: si osserva spesso una discreta iperemia dell'apparato respiratorio.

L'inoculazione del sangue di un coniglio infetto al secondo passaggio sotto cute di altro coniglio ha dato formazione di vasto ascesso.

Il ceppo iniettato sottocute non è molto patogeno per il topino e per il ratto dove non produce sempre morte e da dimagrimento temporaneo come norma; è assai dannoso per la cavia e per il coniglio se la dose di cultura è

forte in rapporto certo ad un meccanismo di azione tossico (talvolta colture cuore e peritoneo negative) non è sempre sicuramente mortale se la dose iniettata è piccola.

Interessante la recettività dell'apparato endoteliale di cavia e coniglio per la attività tossica delle culture: da tener presente sebbene non di manifesta importanza la frequente congestione polmonare e la non rara iperemia tracheale nei soggetti venuti a morte specie nel coniglio.

* * *

C) Introduzione per via endoperitoneale.

Emulsione di cultura da sangue glucosato in liquido Ringer.

Nel topino (8 esperienze), il reperto non si differenzia notevolmente da quello riferito per via sottocutanea; una gran parte degli animali sopravvivono dopo presentato un periodo di malessere e di dimagrimento, altri muoiono in dieci diciotto giorni con cachessia progressiva senza che si riottenga se non in rari casi la cultura pura dal cuore.

Il reperto di autopsia è di solito negativo; in un caso in cui si inoculò dose molto forte si ebbe morte in cinque giorni. I polmoni erano fortemente aumentati di volume, ipermici, e con echimosi sottopleuriche diffuse: nelle sezioni si osservavano emorragie endoalveolari. In questo caso si ricuperò la cultura dal sangue dal cuore.

Nel ratto (3 esperienze), non si ottenne finora che un dimagrimento, talvolta molto marcato (in un caso da 115 a 94 in 15 giorni, in un altro caso da 210 a 75 in 25 giorni); ma alla sezione degli animali uccisi non si osservarono fatti degni di rilievo, salvo la milza alquanto ingrossata.

Nella cavia e nel coniglio (4 esperienze) la morte sopravviene dopo 4-5 giorni con un reperto oscuro.

Si ha imponente essudato emorragico peritoneale che potrebbe dirsi talvolta vera emorragia; gli organi addominali sono esangui ed avvolti da coaguli fibrinosi emorragici, si hanno echimosi alla mucosa gastrica; ematomi perirenali retroperitoneali, zone di infarto emorragico al polmone con echimosi sotto pleuriche, in qualche caso manifesta congestione tracheale. Nella cavia non si hanno modificazioni termiche, nel coniglio ipertermia lieve.

Per quanto le esperienze di infezione per via peritoneale si limitino a 15 in tutto, sembra di poter affermare che il ceppo non risulta per questa via molto patogeno per il topino e per il

ratto, mentre per la cavia e per il coniglio manifesta la sua particolare attività sull'apparato vascolare, da cui emorragie peritoneali e retroperitoneali, e in via subordinata sull'apparato respiratorio dove si comporta in modo analogo a quanto abbiamo visto nelle inoculazioni sottocutanee.

E' possibile che riducendo le dosi di cultura iniettata si giunga ad ottenere un decorso più lento: è interessante tuttavia notare come mentre nelle iniezioni sottocutanee a decorso rapidissimo non si recuperò mai la cultura dal sangue del cuore, traendo da ciò l'impressione di una morte per intossicazione acuta, in questi casi la sopravvivenza per 4-5 giorni e il ricupero della cultura dal cuore fa pensare che il germe abbia avuto tempo di agire in vivo con nuova produzione di sostanze per le quali l'apparato vascolare dei soggetti si mostra particolarmente recettivo.

* *

D) Introduzione per via endovenosa.

Emulsione di cultura da sangue glucosato in liquido di Ringer.

Nella cavia (*giugulare esterna*).

La cavia (4 esperienze) tollera le iniezioni endovenose del ceppo 1931.

Presenta di solito lieve ipertermia per 48-72 ore con qualche remissione mattutina, indi si rimette. Il peso cala nei primi 3-4 giorni per ritornare al livello normale in meno di una settimana.

Il coniglio (*vena marginale dell'orecchio*) (18 esperienze), è assai più recettivo che non la cavia. Il processo dura 4-6 giorni con ipertermia, diarrea, forte diminuzione di peso (in un caso da gr. 850 a 670) indi collasso termico e morte. In qualche caso le oscillazioni termiche sono meno marcate, ma la diminuzione di peso è costante.

Dal sangue del cuore si recupera costantemente la cultura pura. Il reperto microscopico è particolarmente limitato e definito nell'apparato respiratorio dove si osservano zone atelectasiche, infarti emorragici, edema polmonare, echimosi sottopleuriche ed epicardiche.

Nulla si osserva all'endocardio. La milza non è sempre aumentata di volume.

Le iniezioni in serie, reiniettando endovenoso a conigli nuovi il sangue diluito dei conigli morti, dimostrò in tre serie un prolungamento in vita del secondo coniglio che resiste anche sette-otto giorni. Il terzo coniglio presentò lieve ipertermia e diminuzione forte e progressiva di peso che si manifestò per un periodo di

10-15 giorni. In un caso al 15 giorno anche il terzo coniglio è morto dimostrando che l'attenuazione non è sempre completa dopo il 2° passaggio.

Il ceppo per via endovenosa dimostra patogenicità maggiore per il coniglio che non per la cavia per quanto anche nel coniglio si riesca con due iniezioni in serie a rendere limitatamente lesivo e non sempre mortale il ceppo, inoculato assieme al sangue del secondo coniglio.

Non ho esperienza sufficiente finora per affermare se questa minor attività patogena del ceppo di successivo passaggio sia dovuta ad una reale attenuazione del ceppo stesso o ad una quantità sufficiente di anticorpi che si iniettino contemporaneamente.

E' interessante sebbene non assolutamente probativa la elettività di localizzazioni all'apparato respiratorio del coniglio iniettato endovenoso.

* *

Se vogliamo sintetizzare questa esposizione necessariamente troppo analitica, sembra si possa concludere che il ceppo ha limitato potere patogeno generico per il ratto, scarso per il topino, maggiore per la cavia, più forte ancora per il coniglio.

La introduzione per le consuete vie paraenteriche dimostra una speciale affinità del ceppo per l'apparato circolatorio come risulta dalle frequenti emorragie riscontrate nelle più diverse sedi ed anche nell'apparato genitale di femmine specie se gravide. In qualche caso la rapidità del decorso e il reperto culturale negativo fa pensare l'azione sugli endoteli sia in rapporto a sostanze tossiche.

In via subordinata risulta pure una affinità marcata del ceppo per l'apparato respiratorio in quanto nelle iniezioni sottocutanee, endoperitoneali, endovenose questo è costantemente interessato con fatti congestizii semplici delle mucose tracheali e del parenchima polmonare, con infarti, con emorragie interstiziali interalveolari.

Notevole importanza ha a mio parere quanto risulta dalla introduzione del ceppo per via nasale in quanto effettivamente per tale via esso manifesta una affinità elettiva per l'albero respiratorio dove provoca un processo discendente essudativo emorragico che in numerosi esemplari non si differenzia dal reperto del cadavere umano.

Singolare la scarsa compartecipazione della trachea

Pure interessanti sono le tenui reazioni febbrili con forte diminuzione di peso in animali meno recettivi quali risultarono i coniglietti giovani.

In genere può dirsi che forti diminuzioni ponderali, lesione elettiva sull'apparato endoteliale, stimolo congestizio all'apparato respira-

torio, sono i caratteri più generali e costanti osservati nelle diverse vie di introduzione tentata.

Le curve termiche presentano spesso remittenze di breve durata, talvolta la reazione febbrile presenta notevoli oscillazioni, tal'altra si ha una p.ressia continua. Nella cavia la reazione febbrile è minima.

*
* *

Poco conclusive sono finora le ricerche intese a provocare variazioni di recettività dei singoli animali.

Ho già accennato ai buoni risultati avuto dalle iniezioni endovenose in serie, prima di cultura, indi del sangue dei successivi conigli; non è chiaro se ciò dipenda da una attenuazione del ceppo o da contemporanee sostanze immunitarie introdotte.

Per quanto riguarda la variazione di resistenza alle introduzioni del ceppo per via nasale, riferirò brevemente i risultati ottenuti.

Nel coniglio 54 iniettato il 4-11 sottocute con sangue di coniglio infettato per via endovenosa al secondo passaggio, si ebbe formazione di ascesso apertosi il 20-11. Inoculato nel naso il 1-12 (peso 1600) si ebbe morte il 3-12 con imponente lesione broncopneumonica bilaterale (peso 1435).

Il coniglio 22, pretrattato il 1° settembre con inoculazione endoperitoneale di dose minima, fu inoculato nel naso il 4-11 collo stesso sangue del coniglio che diede nel coniglio precedente (54) un ascesso sottocutaneo. Il coniglio 22 muore in tre giorni con sindrome gravissima e con lesioni broncopneumoniche a tipo emorragico.

La cavia 52 inoculata endovenosa con coltura ceppo, il 2-11, non presenta sintomi apprezzabili fino al 25-11 epoca in cui è inoculata per via endonasale (pesa 550); il 27-11 ha temp. 39,4, il 28-11 si inizia uno stato di collasso che la conduce a morte, il 29-11 (peso 435). Lesioni broncopneumoniche disseminate.

Il confronto di tutti questi casi con i reperi precedentemente riassunti dimostra in modo manifesto che nei tre animali pretrattati con iniezioni paraenteriche o di cultura ceppo o di cultura attenuata, si ebbe alla introduzione successiva per via nasale uno stato di ipersensibilità, manifesta anche due mesi dopo il trattamento.

Mi sono molte volte chiesto in quali rapporti stiano questi risultati colla notevole gravità delle sindromi grippali in periodi successivi della pandemia.

D'altra parte trovo nei protocolli altre due esperienze che riferisco.

Il coniglio 53 inoculato 4-11 endovenoso con sangue di coniglio morto al II passaggio (peso 1650), ha lieve ipertermia iniziale, nuova ascensione termica dopo 10 giorni (peso 12,0) indi nessun fatto.

Il 26-11 (peso 1290) è reinoculato nel naso; febbre il 28, 29, 30 (peso 1200) indi nessun fatto. Il 15-12 condizioni generali buone (peso 1480).

Il coniglio 66 bis inoculato endonasale con muco tracheale di coniglio morto in seguito a broncopneumite da inoculazione nasale (peso 1130) presenta lieve ipertermia dopo tre giorni e dopo dieci giorni (peso 1090); reinoculato nel naso il 2-12 con ceppo originale, presenta lieve ipertermia per tre giorni (peso 1050) indi si rimette e il 15-12 pesa 1250.

Se analizziamo queste ultime esperienze, appare che non vi è argomento da concludere bensì stimolo a studiare.

Un caso (66 bis) non dimostra nulla perchè è animale giovane; l'altro caso (con 53) è troppo poco di fronte ai tre esempi di manifesta ipersensibilità prima riferiti.

*
* *

Riassumendo: i caratteri morfologici culturali biochimici e biologici del germe possono concretarsi così:

Diplostreptococchi ad elementi singoli allungati con faccia combaciante appianata, isolati o formanti catenelle di 4-6 elementi in culture di fresco isolate. Gram classico positivo, Gram Weigert negativo in emulsione bene diluita. Presentante qualche diversità di grandezza dei singoli elementi in terreni meno opportuni.

Aerobio, anaerobio facoltativo; non sviluppano sotto 25 con optimum a 37-39.

Dimensioni Micron 0,8 × 1,3 o 1,2 × 1,7 Immobile, senza capsula.

Sviluppo apprezzabile solo in terreni neutri ricchi in aminoacidi e in vitamine tra cui ottimi il sangue glucosato e il Levinthal, formando colonie non confluenti, tipiche del gruppo streptococcico.

Non coagula il latte, non coagula siero diluito con saccarosio, levulosio mannite, inulina, bensì acidifica lievemente quelli con lattosio, glucosio, maltosio e spesso coagula quelli con salicina.

Fortemente emolitico

Non batteriolizzato da bile pura, non moltiplicanti in essa.

Vitalità culturale mediocre in terreni optimum, scarsa in brodo glucosato; virulenza bene apprezzabile in sangue glucosato.

Patogeno per coniglio, cavia, meno per

^t opino pochissimo per ratto, con tendenza a produrre lesioni endoteliali, con affinità notevole per l'apparato respiratorio, capace pertanto di produrre lesioni infiammatorie acute, spesso a tipo emorragico, dell'albero respiratorio se introdotto nelle mucose nasali.

*
**

Questi caratteri fanno rimanere incerti non tanto sulla classifica generica del germe quanto sulla sua precisa definizione.

E' ozioso soffermarsi sull'ipotesi di un germe del gruppo pneumococcico: esso non fermenta inulina, resiste alla bile; il coniglio e il topino non presentano setticemia acutissima se inoculati sotto cute; manca quindi ogni dato per difendere la ipotesi di un germe del gruppo pneumococcus od anche streptococcus mucosus quale potrebbe indursi da osservazione superficiale della morfologia di qualche preparato di cultura non recente non bene decolorato dal gram.

La classificazione del germe nel gruppo streptococcico si impone per la morfologia dei singoli componenti e delle colonie, per la resistenza alla bile, per il comportamento nel brodo.

Non trovo tuttavia un germe batteriologicamente descritto col quale questo si possa accumulare, ne credo corrispondente al grado di evoluzione raggiunto dalla tecnica moderna di differenziazione, acconciarmi alle facili ipotesi della unicità streptococcica.

Questo concetto unitario sostenuto con tanta copia di dati da Koch e ripreso con grande vivacità da Petruschky (*Berl. Klin. Woch* 1902, pag. 299) e recentissimamente da Rosenow (*I. A. M. A.* vol. 60, p. 1223, vol. 61, pag. 1947, vol. 63, pag. 1835) ha certo una importanza filosofica di primo ordine pari a quella che vuole unificare nel gran gruppo Coli tutte le varietà di bacilli intestinali mobili, gram negativi, ma in pratica, come differenziamo e riconosciamo l'autonomia delle singole specie intestinali (tifo, paratifi, dissenterici, ecc.) così possiamo ritenere che analogo fatto stia per essere dimostrato per i germi del gruppo streptococco, di mano in mano che si affini la tecnica e si moltiplichino le osservazioni sistematiche.

Di già nel campo del pneumococco, come prima ho ricordato, Neufeld e Cole sono giunti a stabilire su basi incrollabili differenziazioni che nessuno tra noi avrebbe pensato or sono tre anni

D'altra parte mi si permetta ancora di os-

servare che Koch e Petruschky basano tutta la loro argomentazione sul fatto importantissimo da loro dimostrato che lo stesso streptococco può dare ascessi, setticemie e necrosi e può avere localizzazioni elettive le più diverse e con ciò dimostrano giustamente che non possiamo parlare di uno streptococco del pus, di uno streptococco della endocardite, di uno streptococco della erisipela, ma non hanno per nulla dimostrato che tutti gli streptococchi isolati dal pus o dall'erisipela o dall'endocardite siano culturalmente, biologicamente, immunariamente identici. Le ricerche successive tendono invece a mostrare il contrario.

Le osservazioni di Koch e Petruschky sono dunque esattissime: le deduzioni tratte oltrepassano i dati sperimentali acquisiti.

La molteplicità degli streptococchi si è del resto oggi praticamente imposta, malgrado le tenaci opposizioni di dottrinari o di tecnici arretrati. Anche Burnet e Weissenbach in una recente rivista sintetica (*Bull. Pasteur nov. dic.* 1918) sono di questo parere.

*
**

Ardua è la questione della sistematica, in quanto i caratteri immunitari differenziali non sono sicuramente noti, e per i caratteri biochimici (fermentazione e potere emolitico) non vi è completo accordo.

Converrà a questo proposito ricordare che come in tutti i problemi scientifici molta parte di queste discordanze è in rapporto alla tecnica.

Nel caso delle fermentazioni ad es. molti aa. hanno usato terreni impropri dove il germe cresce stentatamente e dove l'accrescimento si arresta subito che appare un lieve grado di acidità, ovvero terreni dove esistono altri carboidrati che alterano il reperto.

Solo da poco si è diffuso il siero diluito con acqua, come terreno di scelta che dà realmente risultati superiori.

Così pure non è male ricordare l'aureo precetto di Gordon che raccomanda di non far nessun tentativo di identificazione di un ceppo streptococcosimile se non dopo tre successivi passaggi da singole colonie.

Ma sta di fatto che i singoli germi furono descritti dai varii autori in base a determinati caratteri; il confronto delle descrizioni note con i reperti qui esposti può valere a stabilire un punto di notevole importanza dottrinale e pratica nel caso nostro: stabilire cioè se il germe qui descritto sia specie nota o non sia finora definito nelle sue precise proprietà.

In tutti i trattati è dato come carattere co-

mune degli streptococchi quello di coagulare il latte, di fermentare il saccarosio di essere nettamente gram positivi.

Hewlett (*Man. of Bact* 1918) dà come caratteri comuni l'ottimo sviluppo in agar glicerinato [Kolle ed Hetsch (Exp. Bakt 4 aufl 1916), nega questo punto] il non svilupparsi su patata, il coagulare il latte, e riferisce le tabelle diagnostiche di Andrewes e Horder (*Lancet* 24, II, 1906) dove è dato come carattere comune la fermentazione del saccarosio.

Park e Williams (*Man. of Bact.* 1918) confermano che il saccarosio è fermentato da tutti gli streptococchi e danno come attendibile la ingegnosa classificazione di Hollmann che mette appunto a base della distinzione degli streptococchi i caratteri: gram positività, netta fermentazione costante del saccarosio, e del glucosio.

Hopkins e Lang (*Bull. Pasteur* 1918 pag. 705) danno come carattere comune degli streptococchi patogeni e non patogeni la fermentazione del saccarosio.

Non mi persuade la recente proposta di Blake, Ralph, Kinsella, Welch, Russel ed altri che ritengono si debba fare una classe sola degli streptococchi emolitici: adottare questo criterio, equivarrebbe a fare una classe sola dei germi produttori indolo.

Questo streptococco che è a breve catena ma non intorbida affatto il brodo, non dà deposito mucoso, è patogeno per il coniglio, la cavia, il ratto, pochissimo per il topino; non cresce a temperature basse, che è Gram Weigert negativo ma che è ben lungi dall'essere saprofito, che dà sviluppo su patata ma non fluidifica la gelatina, che non coagula il siero con saccarosio, e non coagula il latte, che nel ceppo in piena virulenza non ha dato endocardite nel coniglio, non trova posto nelle classifiche di Lingelshelm Behring, Paschale, Roger, Levaditi, Holman, Lyall, Andrews e Horder, Hopkins e Lang e rimane per me un germe finora non considerato. (1)

Perciò dallo studio della letteratura che ho fatto, quanto più completo mi fu possibile, credo di poter concludere:

1) che il germe qui illustrato non è stato finora definito in una descrizione batteriologica ed è quindi nuovo.

2) che esso non è da considerarsi appartenente al gruppo *s.r. piogenes* o strettamente affini.

(1) Qualche autore ha emesso l'ipotesi di un rapporto tra queste forme e il diplo streptococco dell'influenza dei cavalli di Schütz: come è noto il germe di Schütz coagula il latte.

* * *

Esaurita nei punti fondamentali la esposizione analitica delle ricerche compiute, si presenta il problema del definirle nel loro significato e nel loro valore.

Sarà bene tenere separati i due quesiti.

I, se il germe abbia importanza nella sindrome setticemica e broncopneumonica del grippe;

II, se il germe sia l'agente specifico della pandemia dominante.

Credo che non siano possibili dubbi sul primo punto.

Questo germe che fu riscontrato da solo in cultura pura in casi fulminanti, che è stato isolato ed identificato in una buona percentuale di localizzazioni broncopneumoniche, che nel coniglio, nella cavia e nel ratto riproduce sindromi dell'apparato respiratorio a tipo grippale, se immesso sulle mucose nasali, deve certamente avere parte essenziale nelle sindromi gravi mortali, onde assume per questo solo fatto accertato un'importanza, che risulta sempre più quando si consideri che il reperto batteriologico del cadavere è risultato da queste indagini sistematiche relativamente limitato e ristretto a tipi che non presentano grande interesse batteriologico. Infatti:

1. - uno dei tipi isolati (diplococco lanceolato) non è agglutinato dai sieri specifici Rockfeller ed è con tutta probabilità il pneumococco tipo IV saprofito comune della bocca.

2. - i tipi pseudomeningococcici isolati sono risultati privi di ogni significato patogeno per gli animali e ben da lungo tempo si considerano ospiti innocui delle prime vie aeree.

3. - questi due tipi sopracitati non si riscontrarono mai soli, ma sempre in compagnia di forme streptococciche che in un numero rispettabile di casi furono isolate e identificate come appartenenti al ceppo qui ampiamente descritto.

4. - In casi gravi acutissimi di grippe si è riscontrato soltanto questo particolare streptococco in cultura pura.

5. - Altre forme batteriche, specie streptococciche tutti fermentanti il saccarosio, furono osservate eccezionalmente.

Questi dati fanno considerare con qualche simpatia la ipotesi che il tipo lanceolato e il tipo pseudomeningococcico non siano sempre necessari per riprodurre la sindrome grave grippale pur essendo capaci di esercitare funzione antigena come in numerosi casi risulta per il gruppo pseudomeningococcico.

Ancora sono estremamente suggestive le esperienze dalle quali risulta che in conigli infettati

per via nasale con cultura pura nei quali si svilupparono fatti broncopneumonici, si è talvolta recuperato il ceppo inquinato con forme pseudo meningococche o lanceolate apparentandosi riprodotte le contingenze, che nella clinica umana hanno indotto con una premura giustificata soltanto dall'impotenza terapeutica, ad usare sieri e vaccini pneumococcici o meningococcici.

L'affermare che il germe sia agente specifico esclusivo iniziale della forma pandemica dominante nelle sue svariate estrinsecazioni è per ora prematuro, potrebbe non essere esatto, e non sarà sicuramente dimostrato o escluso se non a pandemia finita.

L'aver riscontrato il ceppo in cultura pura in casi acutissimi non esclude che un altro germe abbia aperto a questo la porta.

Le forme streptococciche sono frequentemente simbiotiche; nella scarlattina il reperto streptococcico è frequente e pure non si ammette che il germe agente sia di questo gruppo.

Buono è il dato della riproduzione della malattia dalle forme leggerissime in coniglietti giovani, con febbre, leucopenia, iperglobulia, alle forme gravi e mortali con broncopolmoniti empiema, setticemia nel coniglio adulto, nella cavia, nel ratto; - suggestiva l'elettività di reazione della trachea dopo iniezioni endoperitoneali o sottocutanee, la tendenza alle emorragie splancniche, endo muscolari, polmonari, negli animali iniettati, interessante il reperto della ipersensibilità degli animali pretrattati, e dell'esaurimento della virulenza colle iniezioni in serie.

Ma non è escluso che altri germi introdotti per via nasale coll'artificio di tecnica che ho ideato, e che potrà avere larga applicazione, possano dare analoga serie di sindromi.

Io non ne ho ottenute con sei ceppi di streptococchi della mia collezione, ma mi guarderei dall'escludere che con un settimo ceppo non si possano ottenere.

Per le prove immunitarie, dirò che i tentativi di agglutinazione non sono bene apprezzabili colle emulsioni che ho ottenuto; la deviazione del complemento con antigene vivo dà luogo ad errori, l'antigene morto ha dato risultati finora insufficienti. Questi risultati non sorprenderanno quanti conoscono le difficoltà di apprezzare obbiettivamente la presenza di anticorpi provocati da germi del gruppo streptococcico.

Riassumendo, frequenza notevole di questo nuovo germe in casi accertati mortali, somiglianza suggestiva di sindromi nella prova speri-

mentale sono i dati positivi che permettono di considerare questo nuovo ceppo come un candidato rispettabile per la definizione etiologica della pandemia dominante. Manca finora un reperto a forti cifre di isolamento in cultura pura in casi leggerissimi; manca pure la dimostrazione su vasta scala del non riscontrarsi questo germe, finora non osservato, in altre sindromi morbose o in condizioni saprofitiche.

Questo ultimo punto evidentemente non potrà essere chiarito che ad epidemia spenta.

* *

L'esame della letteratura accerta che in questa pandemia e nella precedente del 1889-90 esistono insistenti richiami a forme streptococciche a corta catena, emolitiche, gram positive, negative o incerte.

Gli accenni di Bernhardt, Paleani, Bonome, Pietra, Napijus, Hontmann, Gantier, Gruber, Schaedel, Little, Garofalo, Williams, Matters, Randolph, Amato, Di Luna, Cannata, Pagano, ecc., ecc. (1) possono facilmente collimare in singoli punti con quanto sopra è scritto.

Chi più si avvicina a quanto sopra è esposto, è certo Bernhard il quale però descrive nel germe una duplice morfologia di colonie e talvolta una capsula.

D'altra parte, poichè egli afferma la forte patogenicità per il topino, può sembrare non azzardata l'ipotesi che le sue culture contenessero pneumococco (2).

* *

Tengo a stabilire, ed è ben naturale, che in questa nota ho definito batteriologicamente

(1) Amato, di Luna, Pagano, Cannata. — Riv. Sanit. Sicil. 1-10-18.

Arnone. — Rif. Med., 1918.

Bernhardt — Med. Klinik, 1918, p. 683.

Bonome — Rif. Med., n. 48.

Pietra. — Pens. Med., 37, 918.

Paleani — Policl., p. 47, 918.

Mathers. — I. A. M. A., vol. 68, pag. 678.

Napijus e Hontmann — Nederl. Tijdschr., 1918.

Gantier — Med. Verein Greifswald, 19-7-18.

Gruber e Schädcl. — M. M. Woch, 1918 p. 905.

Little, Garofalo, Williams — Lancet, 13-7-18.

Randolph — N. Y. Med. J., vol. 105, p. 293.

(2) Arnone (Rif. Med., Ottobre 1918) e Saccone (Rif. Med. pag. 650, 1918) descrivono negli strisci del lcr morfologie molto simili a quella del germe qui definito.

Ma Arnone isola un ceppo mobile che intorbida il brodo e Saccone insiste sulla disposizione a tetradi e sul potere cromogeno tardivo.

Io suppongo che questi egregi aa. abbiano incontrato inizialmente una cultura mista dove qualche forma simbiotica abbia poi preso il predominio.

in modo sufficiente per la precisa identificazione culturale, un germe, isolato con frequenza dall'uomo morto per grippe, ho stabilito che tale germe messo in contatto colla mucosa nasale di coniglio, cavia, ratto sani è capace di dare sindromi polimorfe non dissimili da quelle che nell'uomo decorrono col nome di grippe o influenza, dal semplice attacco febbrile alla localizzazione broncopneumonica, all'empiema alla encefalite, alla setticemia mortale con marcata tendenza alle emorragie viscerali, con precoci modificazioni della crasi sanguigna, con scarso potere patogeno per gli animali molto giovani.

Ricordo con particolare insistenza il singolare reperto delle ipersensibilità alla inoculazione sulla mucosa nasale dei soggetti pretrattati per via paraenterica, ipersensibilità che potrebbe dare la chiave delle forme gravissime sempre susseguenti alla prima diffusione del

contagio, come pure credo degno di rilievo il fatto dell'esaurirsi della virulenza del ceppo con successivi passaggi in serie del materiale contagiante nel caso della iniezione endovenosa nel coniglio

Oltrepassato questo periodo pandemico, sarà il caso di studiarne la distribuzione in natura, la eventuale presenza in altre forme morbose onde stabilire su sicure basi il significato etiologico di questo germe che richiama però fin da ora la maggior attenzione dei batteriologi e dei terapeuti in quanto ha caratteri di altissima virulenza e di forte patogenicità.

Poichè il germe non risulta finora sicuramente descritto, tenuto presente il periodo e le forme nelle quali esso fu isolato e identificato, nonchè la sua netta azione patogena, ritengo opportuna la denominazione di *Streptococcus pandemicus* (n. sp. 1918).

15-12-918.

**La letteratura internazionale
sulla pandemia 1918**

Apriorismi e ricerche

Numero speciale di *Pathologica*, 15 Novembre 1918 — L. 1,50.

